

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520101153359

UDC _____

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

紫檀芪抗小鼠急性局灶性脑缺血损伤的作用及机制研究

Protective effects and mechanisms of Pterostilbene on acute
focal cerebral ischemia in mice

张雪梅

指导教师姓名: 金鑫教授

专 业 名 称: 药 理 学

论文提交日期: 2013 年 4 月

论文答辩日期: 2013 年 5 月

2013 年 4 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

脑中风是全球人口死亡的一大原因和致残率最高的疾病，其中脑缺血约占4/5。急性脑缺血的发生是由于脑组织血流阻塞引发血栓的形成，并且伴有神经学上的损伤特别是运动神经功能的损伤。然而，目前并没有神经保护作用的有效药物，需要有更多有效的靶点 and 治疗方法。

氧化应激在脑缺血中起重要作用。活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 在脑梗死过程中产生，引发脂质过氧化物和DNA的损伤，这也导致细胞凋亡和坏死。这些损伤发生在与运动和认知功能相关的皮层可能最终导致行为学功能上的障碍，显著的表现转棒和平衡木行走测试评分上。氧化应激还能导致脑缺血后血脑屏障(blood brain barrier, BBB) 的破坏，当血脑屏障收到破坏时，血管对血浆蛋白等大分子的通透性增加，引起脑水肿，加重行为学功能障碍。许多研究表明很多化合物有显著的抗氧化作用，比如，白藜芦醇，能够在局灶性脑缺血模型中显著改善脑缺血。所以，抗氧化疗法成为一个抗急性局灶性脑缺血的一个重要途径。

紫檀芪为白藜芦醇的类似物，最早从紫檀木中分离得到，在蓝莓、葡萄中也有发现，具有很好地抗氧化作用。近期研究表明，紫檀芪具有神经保护及增强认知功能的作用，但其在脑缺血中是否发挥神经保护作用尚不清楚。所以，在本实验中，我们第一次通过观察神经功能的恢复及组织学的变化来研究紫檀芪对局灶性脑缺血，以及紫檀芪对BBB的通透性及脑组织中的氧化应激反应的作用。

本研究中，制备小鼠右侧大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型，90min后再灌。再灌同时及再灌后2h，给予Pte (2.5, 10 mg/kg, ig)。首先在小鼠急性脑缺血模型上，从行为学、组织学上评价Pte抗脑缺血的保护作用。再灌24h后，用Bederson 评分、平横木、转棒实验测定小鼠神经功能缺失；TTC 染色法计算脑梗死体积及水肿百分比；再灌后6h伊文思蓝(evans blue, EB) 的渗漏来评价血脑屏障(BBB) 通透性的改变。其次，用组织病理学的变化和生化酶学方法探索Pte抗脑缺血的机制。对组织切片的甲苯胺蓝染色观察并测定存活神经元的密度；通过TUNEL 分析细胞凋亡状况；通过4-羟基壬烯醛

(4-Hydroxynonenal, 4-HNE)、8-羟基脱氧鸟苷(8 hydroxyguanine, 8-OHdG) 的免疫组化来评价氧化应激程度;测定缺血后超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)活性、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量。

研究结果表明,脑缺血再灌注后给予Pte治疗后,在运动功能上,减少Bederson评分、增强了平衡木行走和转棒实验的表现;组织学上,剂量依赖性的减小了梗死体积并减轻了水肿程度,10 mg/kg剂量作用最明显。这些结果通过甲苯胺蓝和TUNEL染色,在组织病理学上得到深入验证。给予Pte能显著增加存活神经元的数量、减少细胞凋亡。脑缺血引起自由基的形成可以诱发细胞膜的脂质过氧化反应生成4-HNE,也可直接引起DNA损伤生成8-OHdG。免疫组化结果显示,Pte明显减少4-HNE和8-OHdG的阳性表达,缓解氧化应激损伤,提示Pte可减少皮层和纹状体的细胞膜和核苷酸的氧化应激反应。Pte可明显降低脑组织内MDA含量,升高脑内SOD的活性,减轻脂质过氧化物损伤。另外,给予Pte显著地减少EB在脑组织中的渗漏,减轻脑缺血后BBB的破坏程度。

关键词: 紫檀芪 脑缺血 运动功能学 血脑屏障 氧化应激

Abstract

Ischemia stroke is a major cause of death and the primary cause of adult disability in many countries. Cerebral ischemia accounted for about 4/5 in all cerebrovascular disease. Acute ischemic stroke occurs due to the obstruction of blood flow to brain tissue owing to thrombi or emboli and is characterized with neurological deficits especially motor dysfunction. Yet, no ideal neuroprotective agents are available and more new therapeutic approaches should be developed to improve the prognosis.

Oxidative stress plays a key role in acute ischemic stroke. The reactive oxygen species (ROS) generated during the process of ischemic stroke induce lipid peroxidation and DNA damage which may induce apoptotic and necrotic cell death. The damage in motor and sensorimotor related cortex may finally lead to behavioral impairments, notably affecting locomotor as assessed by rotarod and balance beam walking tests. Oxidative stress also leads to blood brain barrier (BBB) disruption after ischemic stroke. The disruption of BBB allows normally excluded intravascular proteins and fluid to penetrate into the cerebral parenchymal extracellular space and leads to vasogenic cerebral edema that exacerbates the behavioral disability. Many studies have indeed revealed that some compounds with significant antioxidant properties such as resveratrol, a well known stilbene, ameliorated the ischemic brain damage in animal models. Therefore, the antioxidant therapy for acute ischemic stroke attracts intense interest.

Pterostilbene (Pte) is a natural stilbene initially isolated from sandalwood and is also found in blueberries and several varieties of grapes. As a structural analogue of resveratrol, Pte also possesses significant antioxidant activity. Recently some studies showed that Pte has neuroprotective and cognitive enhancing properties. However, whether Pte exerts neuroprotective effect against acute ischemia stroke remains unclear. Therefore, in the present study, for the first time, to our knowledge, we

investigated the effect of Pte on acute ischemia stroke, focusing on the recovery of motor function and histological outcome after brain ischemia. Moreover, we investigated the effect of Pte on BBB disruption and oxidative stress in brain tissue.

In our study, transient focal cerebral ischemia was induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 90 min followed by reperfusion. Pet (2.5, 10 mg/kg, *ig*) was administered at the same time of reperfusion and 2 h after reperfusion. Twenty-four hours after reperfusion, motor function of mice was assessed using Bederson scoring, balance beam walking and accelerate rotarod tests. Infarct volume and ipsilateral edema were determined by TTC staining. Toluidine blue staining of coronal sections was used to observe the histopathological changes and to assay the density of surviving neurons. Apoptotic cell death in brain sections was detected using TUNEL assay. The immunohistochemical analysis of 4-HNE and 8-OHdG were used to evaluate the degree of oxidative stress. Blood–brain barrier (BBB) disruption was evaluated by Evans blue (EB) leakage 6 h after reperfusion. Superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) were determined content after ischemia.

Pte treatment decreased the Bederson scores and also improved balance beam walking and accelerate Rota rod performances. Pte treatment reduced infarct volume and alleviated brain edema in a dose-dependent manner; the most effective dose was 10 mg/kg. These observations were further boosted with histopathological changes seen in toluidine blue and TUNEL staining. Treatment with Pte significantly increased the surviving cells and decreased the apoptosis cells. Furthermore, Pte treatment significantly alleviated oxidative stress injury supported by decreased number of 4-HNE and 8-OHdG stained cells in Pte treated brain tissue after MCAO. Cerebral ischemia causes free radical formation which can induce lipid peroxidation of cell membranes resulting in production of 4-HNE and can directly cause DNA damage resulting in production of 8-OHdG. Our results indicate that Pte minimized the oxidative damage of both cell membrane and nucleic acid in brain tissue including the semimotor cortex and striatum. Importantly, we also found that Pte significantly reduced EB leakage in brain tissue, which indicates that Pte alleviated BBB disruption after ischemia stroke.

Key words: Pterostilbene; brain ischemia; motor function; blood–brain barrier;
Oxidative stress

目 录

摘 要.....	I
英文摘要	III
第一章 前言	1
1.1 氧化应激反应与脑缺血的关系	2
1.1.1 自由基与生物抗氧化剂	2
1.1.2 脑缺血再灌注存在氧化应激损伤	3
1.1.3 自由基连锁反应是脑组织缺血再灌注损伤的核心病理环节	4
1.2 脑缺血与神经功能障碍.....	6
1.2.1 脑缺血后神经功能障碍	6
1.2.2 动物脑缺血后行为学的评价方法	7
1.3 紫檀芪 (Pterostilbene) 的概述.....	9
1.3.1 白藜芦醇的生理活性	9
1.3.2 紫檀芪的发现及生理活性	10
第二章 急性脑缺血后运动功能障碍评价方法的建立.....	12
2.1 实验药品及器材	13
2.2 实验动物及分组	13
2.2.1 实验动物	13
2.2.2 实验动物分组	14
2.3 实验方法.....	14
2.3.1 小鼠急性脑缺血/再灌注模型制备	14
2.3.2 Bederson 评分	14
2.3.3 Balance beam 评分方法.....	15
2.3.4 Accelerated rotate 实验方法.....	15
2.3.5 统计学处理	16
2.4 实验结果.....	16
2.4.1 Bederson 评分	16
2.4.2 Accelerated rotate 评分	16
2.4.3 Balance beam 评分	16
2.5 本章小结.....	17
第三章 Pte 对小鼠急性局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用.....	18
3.1 实验器材和试剂	18
3.2 实验动物和分组	19
3.2.1 实验动物	19
3.2.2 实验动物分组及给药	19
3.3 实验方法.....	19
3.3.1 局灶性脑缺血/再灌注模型制备	19

3.3.2 神经功能缺失评分	19
3.3.3 脑梗死体积及脑水肿程度的测定	20
3.3.4 BBB 破坏程度的观察和测定	20
3.3.5 组织冰冻切片制备	21
3.4 实验结果及讨论	22
3.4.1 Pte 对脑缺血再灌注损伤的保护作用及对血脑屏障通透性的影响	22
3.4.2 Pte 对小鼠脑缺血再灌注后 BBB 通透性的影响	25
3.5 本章小结.....	26
第四章 Pte 对小鼠急性局灶性脑缺血再灌注损伤保护作用的机制. 28	
4.1 实验器材和试剂	28
4.2 实验动物和分组	29
4.2.1 实验动物	29
4.2.2 实验动物分组及给药	29
4.3 实验方法.....	30
4.3.1 组织冰冻切片制备	30
4.3.2 组织冰冻切片甲苯胺蓝染色	30
4.3.3 MDA 含量及 SOD 活性测定	30
4.3.4 组织冰冻切片 4-HNE 、8-OhdG 免疫组化染色	30
4.3.5 TUNEL 法分析小鼠急性脑缺血损伤后脑内细胞凋亡情况	31
4.3.6 统计学分析	32
4.4 实验结果及讨论	32
4.4.1 缺血后脑皮层损伤中心区甲苯胺蓝染色	32
4.4.2 Pte 对脑缺血再灌注后脑内 MDA 含量及 SOD 活性的影响	33
4.4.3 缺血后脑皮层损伤中心区 4-HNE 、8-OhdG 的表达	34
4.4.4 TUNEL 法分析小鼠急性脑缺血损伤后脑内细胞凋亡情况	35
4.5 本章小结.....	36
第五章 结论与展望.....	37
缩略语表	39
致谢.....	40
参考文献.....	41

Catalogue

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Relation of Oxidative stress reaction and cerebral ischemia.....	2
1.1.1 Free radical and antioxidant	2
1.1.2 Oxidative stress injury occurred in cerebral ischemia.....	3
1.1.3 Free radical chain reaction is a key pathological process in cerebral ischemia reperfusion injury.....	4
1.2 Cerebral ischemia and nervous dysfunction.....	6
1.2.1 Nervous dysfunction after cerebral ischemia.....	6
1.2.2 Methods to estimate the motor function after cerebral ischemia.....	7
1.3 Overview of Pterostilbene (Pte)	9
1.3.1 Bioactivities of Resveratrol.....	9
1.3.2 Bioactivities of Pte.....	10
Chapter 2 Establish the methods to estimate the motor dysfunction after cerebral ischemia	12
2.1 Materials and methods	13
2.2 Animals and groups	13
2.2.1 Animals.....	13
2.2.2 Animal grouping	14
2.3 Methods	14
2.3.1 Model of focal cerebral ischemia-reperfusion in mice.....	14
2.3.2 Bederson scoring.....	14
2.3.3 Balance beam	15
2.3.4 Accelerated rotate	15
2.3.5 Statistical analysis.....	16
2.4 Result.....	16
2.4.1 Bederson scoring.....	16
2.4.2 Accelerated rotate	16
2.4.3 Balance beam	16
2.5 Conclusion	17
Chapter 3 Protective effects and mechanisms of Pte on acute focal cerebral ischemia in mice	18
3.1 Materials and methods	18
3.2 Animals and groups	19

3.2.1 Animals.....	19
3.2.2 Animal grouping	19
3.3 Methods	19
3.3.1 Model of focal cerebral ischemia-reperfusion in mice.....	19
3.3.2 Neurological deficit scoring.....	19
3.3.3 Determination of infarct volume and brain edema	20
3.3.4 Determination of EB content in brain tissue	20
3.3.5 Statistical analysis.....	21
3.4 Result.....	22
3.4.1 The protective effect of Pte against focal cerebral ischemia-reperfusion and inflation on BBB.....	22
3.4.2 The protective effect of Pte on BBB.....	25
3.5 Conclusion	26
Chapter 4 The mechanisms of Pte on acute focal cerebral ischemia	
in mice.....	28
4.1 Materials and methods	28
4.2 Animals and groups	29
4.2.1 Animals.....	29
4.2.2 Animal grouping	29
4.3 methods	30
4.3.1 Preparation of organizations frozen section	30
4.3.2 Dying by toluidine blue.....	30
4.3.3 Determination of MDA and SOD	30
4.3.4 Immunohistochemical	30
4.3.5 Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP end-labeling (TUNEL) assay	31
4.3.6 Statistical analysis.....	32
4.4 Result.....	32
4.4.1 Dying the injury area by toluidine blue.....	32
4.4.2 The effect of Pte to the content of SOD and MDA.....	33
4.4.3 The expression of 4-HNE and 8-OHdG in the central area of cortex	34
4.4.4 Apoptotic cell death	35
4.5 Conclusion	36
Chapter 5 Conclusion and expectation	37
List of Abbreviations.....	39
Thanks.....	40
Reference.....	41

第一章 前言

脑血管疾病是继恶性肿瘤、心血管病之后,威胁人类健康与生存的第三大疾病,因其具有高发病率、高致残率、高死亡率的特点,为社会家庭带来了严重的经济和精神负担,其中缺血性脑血管病占全部脑血管病的 80%^[1, 2]。随着我国老龄化趋势增强,缺血性脑血管疾病病人数急剧上升^[1]。如何治疗并促进脑血管疾病患者神经功能恢复是科学研究者亟待解决的重大课题,亦是面临的严峻挑战。因此,探寻发挥神经保护作用的药物具有重要现实意义。

机体在进行有氧代谢时可产生活性氧。在正常情况下,体内氧自由基的产生和清除是平衡的。当自由基产生过多或体内抗氧化系统出现故障,体内氧自由基代谢就会出现失衡,自由基蓄积过多,攻击机体,即为氧化应激。脑是代谢率最高的器官,且大部分为有氧代谢获得能量。在缺血时,特别是再灌注时,自由基的产生远远超过自身内源性抗氧化系统的清除能力^[2]。过多的自由基可以引起脂质、蛋白质、核酸的过氧化。

大量研究表明,氧化应激损伤是缺血性脑损伤的核心病理环节^[3]。细胞凋亡是缺血性脑损伤后细胞死亡的重要形式^[4]。而活性氧(reactive oxygen species, ROS)所引发的氧化应激则是造成细胞凋亡的重要环节^[5]。在缺血性脑损伤中,氧化应激不但可以直接损伤细胞,导致细胞坏死,它还可以通过介导线粒体途径、DNA 修复酶及转录因子等间接导致细胞凋亡^[6]。因此,缓解氧化应激反应有助于保护脑缺血再灌注后引起的神经功能损伤。但迄今为止,临床上仍没有公认的具有显著疗效的神经保护剂诞生。因此,探索临床行之有效的神经保护剂将具有重大的意义,抗氧化治疗方法成为抗脑缺血的重要途径之一。

紫檀芪(Pterostilbene)是白藜芦醇的衍生物,两者都具有抗癌、抗氧化、抗炎等的功效。已有研究表明,白藜芦醇是一种有效的抗氧化药^[7, 8],而较白藜芦醇,紫檀芪具有相当甚至更强的抗氧化性^[11-13],然而,Pte是否能通过其抗氧化性在对抗急性脑缺血中发挥神经保护作用尚未知晓。我们首先探索Pte对小鼠大脑中动脉栓塞模型(MCAO)的保护作用,尤其集中在运动功能的恢复及组织学上的影响。另外,我们首次研究了Pte对小鼠脑缺血再灌注后氧化应激的神经保

护作用, 为 Pte的新药开发和临床应用提供实验和理论依据。

1.1 氧化应激反应与脑缺血的关系

1.1.1 自由基与生物抗氧化剂

自由基是指电子轨道上有不配对电子的原子、分子或基因, 包括氧自由基 (OFR) 系列[超氧阴离子 (O^{2-})、羟自由基 (OH^{\cdot})、过羟自由基等]和脂质自由基系列 (烷自由基、烷氧自由基、脂质过氧化物自由基等)。其中 O^{2-} 在生物体内广泛存在, 是诱发自由基连锁反应的启动环节, 其性质极不稳定, 可以不断生成新的活性氧; OH^{\cdot} 则是危害最大的自由基, 它具有较高的反应性, 半衰期短, 扩散能力差^[9]。我们生物体系主要遇到的是氧自由基, 加上过氧化氢、单线态氧和臭氧, 通称活性氧。

生物体内的抗氧化剂可以分为酶类 (如 SOD、过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶(POD))和非酶类(如谷胱甘肽(glutathione, GSH)、维生素 C(Ascorbic Acid, AsA 或 Vitamin C, VC)、维生素 E、类胡萝卜素(carotinoid, CAR))。超氧化物歧化酶(SOD) 是机体内清除超氧阴离子 (O^{2-}) 的特异酶^[10]。机体内存在 3 种 SOD 亚型, SOD1(copper/ zinc SOD, CuZnSOD) , SOD2 (manganese SOD, MnSOD)和 SOD3 (extracellular SOD, ECSOD) 。SOD1 是哺乳动物胞质中主要的酶,含量接近总蛋白含量的 0.1%; SOD2 存在于线粒体; SOD3 存在于细胞外, 如脑脊液、脑血管。这 3 种 SOD 亚型均可以歧化 O^{2-} 生成 H_2O_2 , 继而被过氧化物酶(per2oxisomal) 、过氧化氢酶(catalase)或谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH- Px)清除。在大鼠全脑缺血及局灶性脑缺血模型中,Chan 等^[11]发现在 SOD1 过表达后海马 CA1 区的神经元死亡比对照组减少 50%,SOD1 还可以保护氧化应激所导致的血脑屏障损伤和皮质栓塞的形成^[12]。而在 SOD1 敲除的大鼠神经元死亡数量明显增加^[13]。在永久性局灶脑缺血模型中,SOD2 可明显减少细胞色素 c 的释放,同时减少脑梗塞面积(66%) 。在短暂性局灶脑缺血中同样证明了 SOD2 的保护作用。近年来,Sheng 等又进一步证明了 SOD3 在短暂局灶脑缺血^[14]及全脑缺血^[15]中的保护作用。说明在神经系统中这 3 种 SOD 共同起到了减少氧化应激损伤的作用。其他一些小分子物质如维生素 C 、维生素 E 也参与了自由基的清除^[16]。

一般情况下, 生命是离不开自由基的。生物体每时每刻都从里到外都在燃烧

着能量,而负责传递能量的就是自由基。在正常情况下,体内氧自由基的产生和清除是平衡的。但当自由基产生过多或者清除能力下降导致自由基蓄积时,它们可以和 DNA、蛋白质、多元不饱和脂肪酸(PUFA)等多种细胞成分发生不可逆反应,改变生物结构和功能。

1.1.2 脑缺血再灌注存在氧化应激损伤

1990 年 Sohal 教授率先提出氧化应激的概念。氧化应激是指机体活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生过多或者清除能力下降,氧化系统和抗氧化系统失衡,从而导致潜在性损伤的病理过程^[17]。其中 ROS 包括超氧阴离子、过氧化氢和羟自由基等。

氧化应激与中枢神经系统疾病的发生密切相关,这与中枢神经系统的组织结构、生理及生化特点相关^[18]。活性氧可以与 DNA、蛋白质和多元不饱和脂肪酸(PUFA)作用,造成 DNA 链断裂和氧化性损伤、蛋白—蛋白交联,蛋白—DNA 交联和脂质过氧化。脂质过氧化是造成生物体氧化损伤的主要原因^[19]。PUFA 是生物膜的基本组成,极易被 ROS 引发的脂质过氧化所损伤,造成生物膜结构和功能的破坏,从而引起癌症、衰老、心血管等慢性疾病。另外,脑的重量仅占人体重量的 2%,而脑耗氧量占人体总耗氧量的 20%,需氧量高,产生的氧自由基也较多,神经组织富含对氧自由基敏感的多不饱和脂肪酸,其自身相对缺乏抗氧化物质。因而脑细胞也最易受氧自由基的侵袭伤害。因此,当某些因素使氧化与抗氧化失衡使,氧自由基及氧化产物将造成神经系统损伤^[5, 20]。

近年发展的转基因和基因敲除技术,对过表达或不表达抗氧化酶动物的进一步研究,证明了自由基和氧化应激在缺血性神经细胞损伤中的作用^[21]。缺血性脑血管疾病急性期发生脑缺血及缺血再灌注时,ROS 大量释放,作用于脑血管细胞膜表面,生成环氧化酶 2;线粒体也遭到破坏,促使更多的 ROS 释放。脑细胞缺血缺氧减少了能量生成,导致磷脂酶 A2 活化,裂解膜磷脂,释放出花生四烯酸;再灌注时,花生四烯酸在环氧化酶与酯氧合酶的作用下生成超氧自由基,线粒体以及电子传递链的破坏也能促使超氧自由基的形成,加重脑损伤^[22]。测试 MDA 的含量可以反映机体内脂质过氧化物的程度,间接反应机体细胞受自由基攻击的严重程度^[20]。

1.1.3 自由基连锁反应是脑组织缺血再灌注损伤的核心病理环节

氧化应激在缺血性脑损害中起关键作用。自由基主要通过以下多个途径导致脑组织损伤^[23, 24]：(1) 过量自由基可引起蛋白质、脂质和核酸的过氧化，使膜结构遭到破坏、蛋白降解、核酸主链断裂、透明质酸解聚、细胞崩解、细胞发生不可逆改变，最终导致神经元死亡；(2) 促使花生四烯酸 (AA) 单向转化为血栓烷 A₂，诱导缺血半暗带血管痉挛、血管内血小板聚集，使梗死范围扩大，加重组织损伤；(3) 损伤内皮细胞，引起脑组织的微循环障碍和血-脑屏障通透性增加；(4) 氧自由基产生过多，使兴奋性氨基酸 (EAA) 释放增加及重摄取受阻，导致神经毒性损伤；(5) 通过刺激细胞因子和黏附分子的表达，介导炎症和免疫反应，导致及加重脑组织再灌注损伤；(6) 缺血期间，内源性抗氧化系统并无明显变化，而脂质过氧化物如丙二醛 (MDA)，乳酸脱氢酶 (LDH) 等均明显上升，导致氧化-抗氧化失衡，形成恶性循环。

以前认为，自由基所引起的脑缺血损伤主要是活性氧直接攻击并使脂质、蛋白质以及核酸发生氧化从而破坏细胞。近年来的研究发现，自由基引发的细胞凋亡途径也参与了神经细胞损伤的过程^[25]。

(1) 自由基通过线粒体在脑缺血中引起细胞凋亡

在脑缺血再灌注损伤中，越来越多的证据表明线粒体是氧化应激引起的细胞凋亡的重要通路^[26]。自由基对线粒体 DNA (mtDNA) 和呼吸链的损伤及引发线粒体膜脂质过氧化。线粒体作为胞内的能量库，正常情况下，机体通过线粒体电子传递链产生 ATP，提供机体所需的能量。在缺血时，尤其是再灌注时，线粒体能量代谢发生障碍，脑细胞内 ATP 逐渐耗竭，并通过多种机制导致线粒体功能障碍。依靠 ATP 运转的离子泵 (ATPase) 活性因能量障碍而受抑制，同时因钠泵 ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$) 和钙泵 ($\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$) 活性降低^[27]，导致胞内 Na^+ 和 Ca^{2+} 超载，引起迟发性细胞损伤。

线粒体本身还是产生自由基的来源。正常情况下线粒体氧自由基水平较低，缺血再灌注时其水平会升高。实验证明，缺氧导致的大鼠海马锥体神经元自由基的大量产生可以被线粒体复合物 I 阻滞剂鱼藤酮所阻断，这表明线粒体是自由基产生的主要来源。而应用线粒体钙阻滞剂只能减少部分自由基的产生。相反，应用线粒体通透性转变阻滞剂 CsA 完全阻滞了自由基的产生和钙的积累，并且防止

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库